

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10817

研究課題名(和文) 頭蓋内圧上昇環境でのクモ膜下出血による血管収縮機構への影響とその特異的機序解明

研究課題名(英文) The influence to the vasoconstriction by subarachnoid hemorrhage and the specific mechanism for the developmental of vasospasm under the environment marked by elevated intracranial pressure.

研究代表者

高橋 和孝 (TAKAHASHI, MASATAKA)

秋田大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60321999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クモ膜下出血によって発生する急激な頭蓋内圧亢進とそれにつづく亢進した環境が遅発性脳血管攣縮の促進因子として影響を及ぼしていると考え、頭蓋内圧上昇環境でのクモ膜下出血による血管収縮機構への影響について研究した。

ラット脳血管攣縮モデルで、pressurized artery 法を用いた生理的な環境下に血管反応性についての研究を計画した。脳圧亢進した生体疑似環境を温水槽(チャンバー)に作成し、ガラス管に連結した動物組織から採取した生理的な活性を有したラット血管を連結し、血管収縮性の評価を計画した。しかし、頭蓋内圧が亢進している状態が血管攣縮性の亢進に寄与する実験結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クモ膜下出血による頭蓋内圧上昇が血管リモデリングを誘導し、遅発性脳血管攣縮を発生させる促進因子として影響を与えているという仮説は証明できなかったものの、本仮説を証明することができれば、クモ膜下出血の治療において、脳動脈瘤破裂の治療とともに、頭蓋内圧をコントロールすることをターゲットにした治療に重きを置くことで予後改善に効果をもたらす可能性がある。

本研究については、生理的活性を保ちながら血管を採取・扱いやすい、長時間生理的活性を維持できるように技術を改良するとともに恒温槽チャンバーを改良して、液体が蒸発しないように改良を行い、再挑戦したい。

研究成果の概要(英文)：We formulated a hypothesis that the rapid increase in intracranial pressure caused by subarachnoid hemorrhage and the subsequent increased environment in brain had an effect as an accelerator factor of delayed cerebral vasospasm, and studied the vasoconstrictor mechanism in an environment with increased intracranial pressure at the onset of subarachnoid hemorrhage. Using a rat cerebral vasospasm model, we planned to study vascular reactivity in a physiological environment using the pressurized artery method. We planned to evaluate vascular contractility, by creating a simulated environment in a thermostatic chamber with increased pressure. Physiologically alive and active rat blood vessels that connective to glass tubes were used. However, no experimental results were obtained in which increased intracranial pressure contributed to increased vasospasm.

研究分野：neurosurgery

キーワード：cerebral vasospasm

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血において、脳虚血を引き起こす血管攣縮は臨床上死亡・後遺機能障害の主因であり、医学的管理や手術手技が近年向上しているにもかかわらず、未解決な課題である。

脳血管攣縮の原因・機構を明らかにし、予防法や治療法の確立を目的とした研究が世界的に行われている。脳血管攣縮はクモ膜下出血の血腫によって引き起こされ、血腫のオキシヘモグロビンが脳血管攣縮に対して重要な要因であることが知られているが、脳血管攣縮の強さ・継続時間を決定する真の原因とその物質は不明である。動脈瘤破裂によるクモ膜下出血例で多くの脳血管攣縮が発生するが、動脈瘤破裂時に急速な頭蓋内圧亢進もまた、血腫内のオキシヘモグロビンによる脳血管攣縮の促進因子としてなんらかの影響を及ぼしていると推察される。

2. 研究の目的

本研究では頭蓋内圧亢進環境を再現した状態では、クモ膜下出血による脳血管収縮性がどのように変化しているのかを検討する。つまり、頭蓋内圧上昇がクモ膜下出血の血管リモデリングにどのように影響しているかを検討するものである。頭蓋内圧上昇環境での血管収縮性や血管拡張性の変化、血管内皮や中膜に発現性が増大する遺伝子・タンパク質についても評価する。より生体内の環境に近い状態をシミュレーションすることで病態解明に貢献できると思われた。

研究では pressurized artery 法の恒温槽チャンバーを密封し、溶液層に頭蓋内圧に相当する圧をかけた環境での血管反応性を評価し、高頭蓋内圧をかけた状態での血管に新たに誘導された遺伝子・タンパクなどについて検討する。リモデリングされた血管で発現性に变化している遺伝子・タンパクとしては第一に血管の緊張・収縮を制御する Ca 制御系を想定した。

3. 研究の方法

- 1 血管の採取とヘモグロビン精製 SD ラットに吸入麻酔後、仰臥位で大腿動脈から自己動脈血を採取し、オキシヘモグロビンを分離・精製した。 -2 Pressurized artery 法による検討 摘出後保存しておいた動脈を両側でガラス管に繋ぎ固定する。動脈からの分枝は結紮する。この方法は生体の条件に近づけるため、血管採取時に測定した生体での血管外径と同径、血管内腔にかかる内圧を決定する。組織観察用の容器に血管を入れ、血管外と血管内はいずれも Krebs-Henseleit 緩衝液で満たし、血管外にオキシヘモグロビンを投与して、クモ膜下出血を再現した。さらにチャンバーの圧を変化させ、その場合の血管径を測定しながら、KCL をチャンバー溶液内に加えて血管の収縮性の評価を行った。一連の作業は実態顕微鏡下に観察しながらデジタルビデオカメラで記録保存し、専用解析ソフトで解析した。

4. 研究成果

1.動物モデル a)SD ラットに吸入麻酔後、仰臥位で大腿動脈から自己動脈血を採取し、ヘパリン加で遠心分離を行った。酸化ヘモグロビンを分離して、吸光度で濃度評価後に-80度で保存した。酸化ヘモグロビンは十分な濃度で精製できた。

b) 動脈採取 吸入麻酔下に胸部切開を行い右心に氷冷のPBSの還流を行った。血管径を測定後に大腿動脈を採取し、PBSに浸しつつ、-4で保存した。

2.pressurized chamber 動脈両側端を吻合した内外に圧を掛ける恒温槽チャンパー設定は難渋した。いままでは大気圧下での使用であったため、チャンパー内全体に圧を掛けるため閉鎖腔とした。圧を掛けて内腔圧を確認すると圧の上昇がみられず、シーリング、ゴム類、パッキン類を見直し、圧が掛かる状態とした。恒温槽チャンパー内溶液の酸素化のため、95%酸素、5%二酸化炭素を恒温槽チャンパー内腔を充填することで、圧がチャンパー内に係る状態であることを確認した。また、恒温槽チャンパー内の水溶液は37度を保つが時間経過すると恒温槽チャンパー内に塩が析出してくるため、水溶液の濃度変化が起こってきた。内容液は酸素化した状態で古い内容液から新しいものに交換することとした。吻合した血管内圧は血管外(血管周囲圧、つまり恒温槽チャンパー内圧よりも高いか同等以上)よりも高く設定しなければ血管は潰れるが、一定の維持とその調整に難渋した。

3.pressurized 恒温槽チャンパーへの採取血管の吻合

採取した大腿動脈を恒温槽チャンパー内のガラス管に吻合したが、4-0絹糸をほぐした糸を用いた。吻合が弱くは血管内液が漏れ出すこととなるが、ガラスの表面に吻合するのは難しく時間もかかった。結果吻合ができたとしても、血管にダメージが加わってしまうため、実際に薬液を投薬した状態で反応が得られなかった。結論として、血管はその間にいわゆる生きたな状態ではなく、生理的活性を維持できていなかったと判断した。



Pressurized 恒温槽チャンパー全景

4. 実験期間内に行えなかった今後の課題・対応策

a) 血管について

研究者はこれまで、ビーグル犬を使用したラットよりも太い血管を用いて pressurized artery を行っていた。ラットでも行っている文献はあったが、我々の実験装置では難しかった。そのため、動物種をさらに太い動脈採取が見込める、うさぎを用いることが一つの解決策となると考えている。血管径が太くなり、採取できる長さも見込めることから、血管の生理的活性を保ちやすくなると考え、今後はうさぎで計画したい。

また、血管の生理的な活性を維持するためには4 で血管の代謝を落とした状態で血管をガラス管に吻合することを考えたい。

b) 新しい恒温槽チャンバー・ガラス管の制作

今回用いた恒温槽チャンバーの改良も血管が生理的な活動性を維持するのに重要であると思われる。恒温槽チャンバー内で血管吻合をすると、血管に触れて作業する回数と時間が増える。ガラス管と血管吻合部分はカセット式(あるいはアタッチメント式)としてチャンバーと比較して広い・吻合に妨げるものの無い空間で吻合できるように改良する。また、血管吻合の工夫 ガラス管の先端に突起を付けたものを作成し吻合糸が引かかり、確実な縫合で時間も短縮したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 宏明 (Shimizu Hiroaki) (20506638)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関